

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологий
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В. А. Кратасюк

подпись

« _____ » _____ 2018 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

06.03.01 БИОЛОГИЯ
06.03.01.07 БИОФИЗИКА

Оценка работы антиоксидантной системы слюны у спортсменов в период
интенсивной физической нагрузки методом хемилюминесценции

Научный руководитель

доцент, Коленчукова О.А.

д. б. н

Студент _____

номер группы, номер зачетной книжки

Бирюкова Е.А.

Красноярск 2018

Реферат

Выпускная квалификационная работа по теме «Оценка работы антиоксидантной системы слюны у спортсменов в период интенсивной физической нагрузки методом хемилюминесценции» содержит 28 страниц, 12 источников, 5 формул, 16 рисунков.

АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА, ФИЗИЧЕСКАЯ НАГРУЗКА, АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ, ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, СЛЮНА, СПОРТСМЕНЫ

Объект исследования – антиоксидантная система слюны спортсменов.

Цель исследования: оценка работы антиоксидантной системы слюны спортсменов в период интенсивной физической нагрузки.

В результате проделанной работы были обнаружены адаптивные изменения антиоксидантной системы слюны в зависимости от вида спорта и квалификации спортсмена. Так же был проведен мониторинг антиоксидантной системы в течение тренировочной недели.

В итоге был разработан быстрый и безболезненный метод для оценки работы антиоксидантной системы слюны у спортсменов.

Содержание

Введение.....	4
1 Обзор литературы	5
1.1 Молекулярные основы продукции свободных радикалов	5
1.2 Оксидативный стресс	7
1.3 Физиологические функции активных форм кислорода	8
1.3 Система антиоксидантной защиты	10
1.5 Хемилюминесценция.....	13
1.6 Влияние физической нагрузки на выработку АФК.....	14
2 Материалы и методы	16
2.1 Материалы исследования.....	16
2.2 Методы исследования.....	16
3 Результаты исследования	18
Выводы	26
Список использованных источников	27

Введение

Физическая нагрузка является неотъемлемой частью нашей жизни. В движении здоровый человек проводит большую часть своей жизни. В повседневной жизни обычные люди несут равномерную бытовую нагрузку, к которой организм адаптирован с рождения. Но если человек начинает заниматься спортом и регулярно испытывает повышенные физические нагрузки, в организме запускаются процессы адаптации к ним. Неоднократными опытами и экспериментами доказано, что некоторые физиологические процессы в организме спортсмена отличаются от процессов, происходящих в организме нетренированного человека.

В ходе физической активности в организме человека в большом количестве образуются активные формы кислорода (далее - АФК), которые негативно влияют на клетки, вызывая окислительные повреждения ДНК, окислительную денатурацию белков, а также повреждение липидных мембран клеток. Чем интенсивнее нагрузка, тем большее количество АФК образуется в организме.

Что бы нейтрализовать данное воздействие, у человека функционирует система антиоксидантной защиты (далее - АОС), которая нейтрализует АФК различными методами.

Цель моего научного исследования заключалась в оценке работы антиоксидантной системы слюны спортсменов в период интенсивной физической нагрузки.

Для достижения цели была поставлена следующие задачи: исследовать различия в работе АОС спортсмена в динамике тренировочного процесса, исследовать различия в работе АОС в зависимости от вида спорта и характера нагрузки, исследовать различия в работе АОС спортсменов в зависимости от спортивного разряда.

1 Обзор литературы

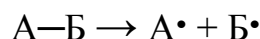
1.1 Молекулярные основы продукции свободных радикалов

Свободным радикалом является атом или молекула, которая содержит один или более неспаренных электронов, на внешнем энергетическом уровне, что придает радикалу высокую химическую активность. Радикалы могут быть заряжены или не заряжены.

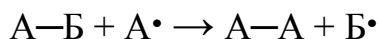
Системы атомов и молекул обычно стремятся к состояниям с наименьшими энергиями, которые достигаются путем связывания двух радикалов и образованием ковалентной связи. Некоторые связи могут разрываться и в случае, когда каждый из двух фрагментов спин-пары, нерадикальной молекулы удерживает один из электронов, связь которых разорвалась, образуются два радикала.

Существуют 3 типа радикальных реакций:

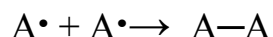
- 1) Реакции, в которых количество радикалов увеличивается



- 2) Реакции, в которых количество радикалов не изменяется



- 3) Реакции, в которых количество радикалов уменьшается



Свободные радикалы являются продуктами нормального клеточного метаболизма, а также результатом реакций, стимулированных некоторыми болезненными процессами. Многочисленные исследования показали, что свободные радикалы обладают потенциалом производить часть изменений тканей, связанных с экспрессией различных токсических веществ [11].

90% молекулярного кислорода, который потребляет человек, вовлекается в реакции окислительного фосфорилирования. Вместе с тем, в организмах живых существ непрерывно идут реакции, с образованием активированных метаболитов кислорода (АМК): O_2^- , OH , $RO\cdot$, H_2O_2 , OCl и т.д. Многие из этих соединений являются радикалами, поэтому их часто называют свободными радикалами. Связанные радикалы так же присутствуют в живых клетках, но их локализация в определенных структурах не позволяет им свободно взаимодействовать с другими молекулами.

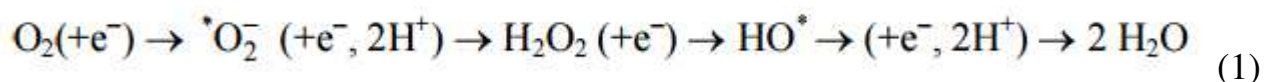
Применительно к биологическим системам понятия «свободные радикалы» и «АМК» не совпадают, так как неспаренный электрон может быть локализован на атомах углерода, серы, азота. Так же для живых организмов важное значение имеют тиольные радикалы глутатиона (GS^*) или радикалы мочевой кислоты с локализацией электрона на атомах S, N. С другой стороны, такие кислородсодержащие молекулы как перекись водорода, синглетный кислород не являются радикалами, хотя и взаимодействуют с органическими

молекулами через радикальные механизмы. Что бы объединить данные соединения в одну группу с радикалами, вводят понятие «активные формы кислорода» (АФК), которыми обозначают ферментативные продукты кислородной активации. По аналогии с активными формами кислорода иногда говорят об активных формах азота, галогенов, липидов [12].

Радикалы, произведенные кислородом, являются самым важным классом видов активных радикалов, образующихся в живых системах. Молекулярный кислород является дирадикалом и присутствует во всех аэробных живых организмах. Он имеет уникальную электронную конфигурацию. Добавление одного электрона к дирадикалу кислорода формирует супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$). Супероксидный анион, возникающий либо в результате метаболических процессов, либо после “активации” кислорода физическим облучением, считается “первичным” АФК и далее может взаимодействовать с другими молекулами для генерации “вторичных” АФК непосредственно, или через ферментные или металл-катализируемые процессы [11].

Образование АФК у млекопитающих происходит во всех органеллах клетки, но большую часть из них генерируют митохондрии. Эти органеллы отвечают за жизненно важную функцию-синтез АТФ, но при преобразовании энергии небольшое количество электронов “просачивается” в кислород преждевременно, образуя супероксидные радикалы кислорода, которые оказывают негативное воздействие на организм.

В дыхательной цепи митохондрий, происходит и 1-, 2-, 3-электроное восстановление с образованием АФК по формуле (1):



Донорами электронов являются металлы с переменной валентностью (главным образом Fe^{2+} , а также Cu^{2+} и другие), входящие в состав ряда ферментов [3].

Супероксид продуцируется комплексами I и III электронной цепи и в анионной форме он быстро пересекает внутреннюю мембрану митохондрий. Гидроксильный радикал HO^{\cdot} , является нейтральной формой ион гидроксида. Радикал гидроксила имеет высокую реактивность, что делает его очень опасным радикалом с периодом полураспада *in vivo* приблизительно 10^{-9} с. Таким образом, образовавшийся гидроксильный радикал реагирует очень близко к сайту своей формации. Редокс-состояние клетки в значительной степени связано с железной (и медной) редокс-парой и поддерживается в строгих физиологических пределах. Было высказано предположение, что регулирование железа в организме гарантирует отсутствие свободного внутриклеточного железа. Однако, *in vivo* в стрессовых условиях избыток супероксида высвобождает “свободное железо” из железосодержащих молекул.

Высвобожденное Fe^{2+} может участвовать в реакции Фентона, производя высоко реактивный радикал гидроксила ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \bullet\text{OH} + \text{OH}^-$). Высвобождение железа супероксидом было продемонстрировано для кластера [4Fe-4S], содержащего ферменты семейства дегидратазы-лиазы.

Таким образом, под условиями стресса, $\text{O}_2^{\bullet-}$ действует как оксидант в [4Fe-4S] кластере, содержащим энзимы и облегчает продукцию $\bullet\text{OH}$ от H_2O_2 путем доступности Fe^{2+} для реакции Фентона.

Помимо свободных радикалов кислорода, в организме продуцируются реактивные формы азота. Они существуют в виде оксида азота ($\text{NO}\bullet$). $\text{NO}\bullet$, это небольшая молекула, которая содержит один неспаренный электрон на $2p_y^*$ орбитали. $\text{NO}\bullet$ генерируется в биологических тканях специфической азот синтазой (NOSs), которая метаболизирует аргинин в цитрулин с образованием $\text{NO}\bullet$ через 5 электронов оксидативной реакции [11].

1.2 Оксидативный стресс

Окисление — это удаление одного или нескольких электронов из молекулы. И наоборот, восстановление определяется как добавление одного или нескольких электронов. Баланс между оксидацией и восстановлением необходим во всех химических реакциях. Когда одно вещество окислено, другое вещество необходимо восстановить. В биологических системах этот поток электронов из восстановителей и окислителей приводит к массиву динамических стационарных состояний, которые могут быть сдвинуты различными классами молекул, которые оказывают различное воздействие на функции клеток или клеточные компартменты. Источником восстановителей служит, например, пища, а основной источник окислителей - молекулярный кислород.

Молекулярные изменения, опосредованные сдвигами в окислительно-восстановительных стабильных состояниях, могут изменять функции клеток. Изменения могут быть ответом на сигнальные стимулы трансдукции, или могут способствовать повреждению клеток и тканей, в зависимости от характера и степени произведенных сдвигов.

Термин «оксидативный стресс» первоначально определялся как "нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса в пользу первого, который приводит к потенциальным повреждениям" (Sies 1985), в результате увеличения производства окислителя или уменьшения восстановительной способности ткани, или сочетание этих процессов [11].

Эти нарушения могут быть вызваны различными факторами, такие как воспалительный процесс, нарушение метаболизма, повышенная физическая нагрузка и т.д.

Но необходимо учитывать и тот факт, что окислительный стресс дополнительно может быть вызван не только нарушениями метаболизма и

гомеостаза, но и факторами окружающей среды. Ее загрязняющие вещества могут вызывать окислительный стресс на клетках через механизмы, которые являются прямыми, косвенными или включают нарушение метаболических или биоэнергетических процессов, которые регулируются тиоловыми окислительно-восстановительными переключателями. Однако, важное механистическое различие необходимо сделать между агентами, которые стимулируют оксидативный стресс сразу и теми ксенобиотиками, которые сами не оксидативны, но могут стимулировать оксидативный ответ от клетки. Тем не менее, даже учитывая только экологические агенты, которые являются первичными окислителями, их неоднородность поражает. В перечень экологических токсикантов, являющихся непосредственно окислительными, входят газообразные загрязнители, такие как озон, Cl_2 и фосген. Кроме того, целые классы органических электрофилов на примере акролеина, ароматических хинонов и изопренов действуют через окислительные реакции, в то время как ионы тяжелых металлов цинка, свинца, ртути и кадмия способны координировать действия с сульфгидрильными группами на пептиды и белки, способствуя их окислению [10].

1.3 Физиологические функции активных форм кислорода

В тканях организма кислород вступает в реакции в виде АФК. Важнейшими АФК считаются: супероксид анион-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), перегидроксильный радикал (HO_2^{\cdot}), гидроксильный радикал (HO^{\cdot}), перекись водорода (H_2O_2), синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), озон (O_3), гипохлорит (HOCl).

Из-за высокой химической активности АФК оказывают большое токсическое действие на организм. Значительным повреждениям подвергаются клеточные мембраны. АФК способны вызывать цепное окисление липидов в соответствии с рисунком 1. Свободный радикал «захватывает» один электрон липидной молекулы, превращая её в липидный радикал. После чего липидный радикал инициирует дальнейшее окисление молекул [1].

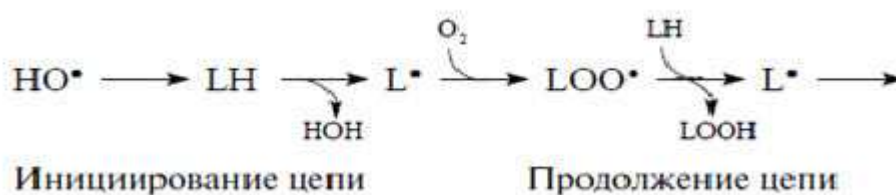


Рисунок 1 - Цепное окисление липидов под действие АФК

Таким образом АФК нарушают ненасыщенные связи в липидных молекулах, из которых состоит билипидный слой клеточных мембран. Следовательно, наблюдается потеря текучести мембран, нарушение рецепторов и последующий клеточный лизис.

Усиленное производство АФК при окислительном стрессе приводит к окислению белков, перекисному окислению липидов, ферментов

ингибирование и повреждение ДНК, все это может активировать пути клеточной гибели.

Высокие уровни АФК могут приводить к изменению белковых молекул. Модификация белков может привести к «раскрытию» и изменению конформации, изменению взаимодействия с биологическими агентами. Белки могут быть модифицированы непосредственно путем нитрозилирования, карбонилирования, образования дисульфидной связи и глутатионилирования или косвенно путем конъюгации с продуктами распада пероксидации жирных кислот. Высокие уровни АФК могут также привести к фрагментации белка путем окисления боковых цепей аминокислотных остатков, окисления белкового основания и образования белок-белковых перекрестных связей. В тканях с высоким уровнем окислительного стресса высокие уровни карбонилированных белков используются в качестве маркеров окисления белков. Высокий уровень карбонилированных белков наблюдается при различных заболеваниях, таких как ревматоидный артрит, болезнь Альцгеймера, диабет, сепсис и хроническая почечная недостаточность.

Различные аминокислоты имеют различную подверженность к нападению АФК. Например, тиоловые группы, которые имеют серосодержащие аминокислоты, и остатки метионина очень чувствительны к окислению.

Высокий уровень АФК может вызывать перекисное окисление липидов в клеточных мембранах и органеллах, которые могут привести к инактивации мембраносвязанных рецепторов и ферментов, влияющих на нормальное функционирование клеточного аппарата. Метаболизм малонового диальдегида, продукта перекисного окисления липидов ненасыщенных жирных кислот, приводит к повреждению клеточных мембран и инактивации многих клеточных белков путем образования белковых перекрестных связей. Оксидативный стресс усугубляется продукцией липидов-производных радикалов, которые могут белки и ДНК. В стрессовых условиях уровни перекисного окисления липидов коррелируют с АФК-опосредованным повреждением клеток. Ненасыщенная (двойная) связь в молекулах фосфолипидов и связь эфира между глицерином и жирной кислотой служат общими сайтами для окисления, вызванного АФК. Следовательно, полиненасыщенные жирные кислоты мембран фосфолипидов особенно чувствительны к окислению АФК. Дисбаланс в соотношении антиоксидантов и окислителей может привести к перекисному окислению многих полиненасыщенных жирных кислот, приводя к циклической цепной реакции

Избыток АФК может вызвать окислительные повреждения как сахаров, так и основных фрагментов ДНК, что приводит к дезоксирибозному окислению, разрыву нитей, различным модификациям органических оснований нуклеотидов, приводящим к последующим мутациям, и перекрестным связям белка ДНК. Повреждение ДНК может вызвать изменения в закодированных белках, приводящие к сбоям или полной инактивации белков. Повреждение

сахаров происходит из-за абстракции водорода от дезоксирибозы, в то время как окислительная атака на ДНК базируется на присоединении ОН к двойным связям. Избыток АФК может привести к необратимому повреждению ДНК, несмотря на систему восстановления ДНК.

Несмотря на свою роль в повреждениях и в влиянии на патологии, которые связаны с окислительным стрессом, АФК участвуют в многочисленных физиолого-психологических процессах, таких как рост клетки, некроз, апоптоз, деятельности протеаз и экспрессии генов. Влияния АФК очевидны в деятельности скелетных мышц, нервной системе.

Наиболее благотворно АФК влияют на сбои, возникающих в работе иммунной системы, заживлении повреждений, предотвращении развития инфекций [8].

Фагоциты активируются бактериями (или механическими частицами и пр.), что сопровождается активацией ферментного комплекса плазматической мембраны — НАДФ *Н-оксидазы с образованием $O_2^{\bullet-}$ из O_2 . Это приводит к быстрому многократному повышению содержания $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 в фагоцитирующих клетках с одновременным увеличением ими потребления кислорода в 20 и более раз («дыхательный взрыв»). Высвобождение АФК в ходе «дыхательного взрыва» происходит как в фагосоме, так и в среде. Эти АФК разрушают бактерии и поврежденные, старые, иммунологически несовместимые злокачественные клетки [1].

1.4 Система антиоксидантной защиты

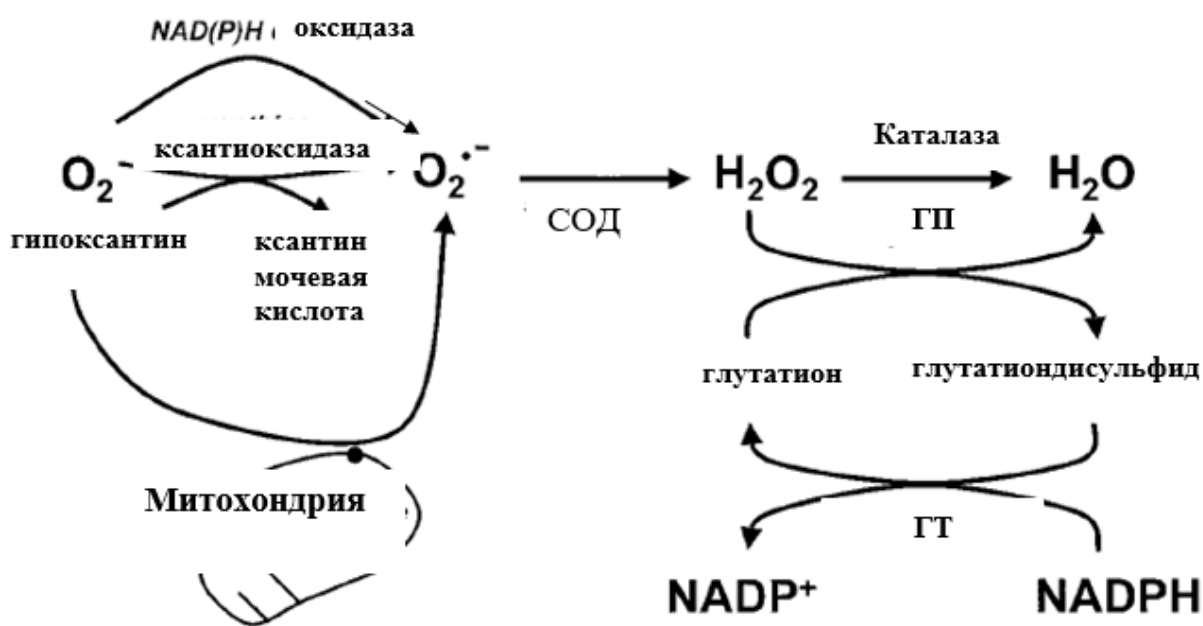
Происхождение свободных радикалов от разнообразных источников вынудило организмы создать серию механизмов обороны. Механизмы защиты от окислительного стресса, вызванного свободными радикалами, включают: превентивные механизмы, механизмы восстановления, физическую защиту и антиоксидантную защиту. В нормальных условиях, баланс между и деятельностью и внутриклеточными уровнями этих противостарителей необходим для выживания организмов и их здоровья.

Для борьбы с «лишними» АФК существует система антиоксидантной защиты (АОС). АОС представлена ферментативными и неферментативными компонентами.

Неферментативное звено АОС состоит из соединений низкомолекулярной и белковой природы (мелатонин, нейропептиды). Некоторые витамины проявляют антиоксидантную активность. Витамин С связывает и инактивирует АФК и органические пероксиды; защищает липиды от окислительного повреждения, захватывая свободные радикалы до того, как они достигают мембраны; восстанавливает окисленную форму витамина Е. Витамин Е, играет ведущую роль в антиоксидантной защите головного мозга

нейтрализует синглетный кислород, защищает клеточные мембраны и хроматин; каротиноиды также являются природными антиоксидантами.

Ферментативная АОЗ представлена такими ферментами, как СОД – супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионтрансфераза, глутатионредуктаза, формальдегидрогеназа. На рисунке 2 показан синтез супероксидного аниона в дыхательной цепи с его последующей нейтрализацией, в ходе данного процесса NADPH окисляется до NADP⁺. Действия ферментов-антиоксидантов тесно связаны друг с другом и четко сбалансированы между собой. Нарушение соотношения ферментативных компонентов АОЗ может приводить к дополнительной генерации АФК, что ведет к повреждению клеточных структур [3].



Ферменты: СОД – супероксиддисмутаза, ГП – глутатионпероксидаза, ГР – глутатионредуктаза;

Рисунок 2 - Синтез супероксидного аниона

В виду того, что супероксид основное АФК производится от разнообразных источников, дисмутация СОД является наиболее важной для каждой клетки. Все 3 формы СОД (CuZn-СОД, Mn-СОД и ЕС-СОД), широко выражены в легких человека. Mn-СОД локализована в матриксе митохондрий. ЕС-СОД главным образом локализована во внеклеточном матриксе. Она также обнаружена в эпителии бронхов, альвеолярном эпителии и альвеолярных макрофагах. В целом, CuZn-СОД и MN-СОД существуют, как правило, в качестве объемных поглотителей радикалов супероксида. Относительно высокий уровень ЕС-SOD в легком с его специфическим связыванием с

компонентами внеклеточного матрикса может представлять фундаментальный компонент защиты легочного матрикса.

Каталаза существует как тетрамер, состоящий из 4 одинаковых мономеров, каждый из которых содержит группу гема в активном центре. Деградация H_2O_2 выполнено через преобразование между 2 конформациями каталазы-ферумкаталаза и соединения I (комплекс железа с атомом кислорода). Каталаза также связывает NADPH как восстановительный эквивалент для предотвращения окислительной инактивации фермента, поскольку H_2O_2 деградируется до воды [7].

Основными защитными функциями глутатиона против оксидативного стресса являются:

- 1) он является кофактором нескольких ферментов детоксикации от окислительного стресса, например, глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы и др.;
- 2) участвует в транспорте аминокислот через плазматическую мембрану;
- 3) очищает гидроксильный радикал и синглетный кислород напрямую, путем детоксикации перекиси водорода и липидных пероксидов под каталитическим действием глутатионпероксидазы;
- 4) может регенерировать самые важные противостарители, витамины С и Е, назад к их активным формам [11];

Суммарное содержание антиоксидантов в организме – достаточно емкое понятие, существуют различные методы анализа, однако, общую суть методов можно свести к измерению соотношения свободных радикалов в организме. Первоначально для анализа использовалась плазма крови, однако сейчас существуют методы для анализа различных биологических компонентов, но, как правило, используются способные к перекисному окислению субстраты (липиды, плазма, семенная жидкость, слюна). Методы анализа данных образцов достаточно просты, что приводит к высокой популярности подобных исследований.

Анализ антиоксидантов проводят с двумя основными целями: показать зависимость АОЗ организма от потребления антиоксидантов в пище; второй целью является связать изменение антиоксидантного статуса с различными функциональными состояниями организма [5].

Стоит заметить, что методы измерения антиоксидантного статуса организма имеют недостатки. Эксперименты с людьми необходимо тщательно прорабатывать, при этом учитывать особенности питания, образа жизни каждого человека, так как это оказывает влияние на метаболизм. Не стоит забывать, что результаты могут носить временный характер, т.е. отражать ситуацию не в общем виде, а в частном варианте на данный момент времени.

1.5 Хемилюминесценция

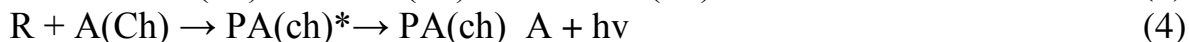
Хемилюминесценция (ХЛ) – это явление, при котором химическая реакция сопровождается выделением кванта света, т.е. свечением. На основании данного явления существуют различные методы исследования, получившие широкое распространение во множестве отраслей. Это аналитическая химия – высокочувствительный анализ обнаружения различных веществ; экологический мониторинг воздуха, вод и почв; исследование продуктов питания: овощей, фруктов и масел. Также метод применим в области биомедицины. С помощью ХЛ проводят разнообразные клинические и фармакологические исследования, в том числе анализ количества АФК и работы АОС. Типичная ХЛ реакция отображена в формуле (2)



где, А и В – исходные вещества; С, D – продукты реакции; С* – электронно-возбужденное состояние;

$h\nu$ – квант света.

Реакции образования АФК обладают собственной хемилюминесценцией. Например, образование синглетного кислорода (1O_2). Образованный синглетный кислород переходит в основное (триплетное состояние), реакция сопровождается выделением кванта света. Стоит заметить, что реакции образования АФК обладают низкой интенсивностью ХЛ, т.н. сверхслабое свечение. Фиксирование такого свечения весьма затруднительно, и редко применяется в лабораторной практике. Для увеличения свечения применяют специальные вещества, называемые активаторами ХЛ-свечения. По механизму действия разделяют физические и химические активаторы. Физические активаторы не влияют на химическую реакцию, но способны увеличивать квантовый выход испускания фотона путем физического переноса энергии от возбужденного продукта к молекуле активатора. Процесс описывается формулой (3). При физическом активировании ХЛ достигается увеличение квантового выхода на 3-4 порядка. Физическими активаторами являются: родамин Ж, кумарины, хлорофилл А и другие.



где, R – радикал; P – продукт реакции; A(Ph) – физический активатор; A(Ch) – химический активатор; PA(ch) – продукт превращения молекулы активатора; P* A* – электронно-возбужденное состояние; $h\nu$ – квант света.

Химические активаторы, напротив участвуют в химической реакции и являются продуктом реакции (4). При химической активации, реакция, по сути,

идет иным путем. Люминол помогает выявить весь пул АФК, а также суммарную активность ферментов, ионы некоторых металлов [1].

1.6 Влияние физической нагрузки на выработку АФК

Роль оксидативного стресса в физиопатологии скелетных мышц довольно сложна. Быстрое увеличение уровня оксидативного стресса может быть отражением нормального стимулирующего процесса, в то время как бесконтрольное накопление может иметь патологическую импликацию. Существует все больше доказательств того, что низкие концентрации активных форм кислорода индуцируют экспрессию антиоксидантных ферментов и других защитных механизмов.

Физические упражнения связаны с производством АФК, которые могут играть ключевую роль в благотворном воздействии физической активности. Тренировка на выносливость повышает окислительный, обменный и тепловой стресс в мышцах, который активизирует различные клеточные сигнальные пути, которые приводят к мускульным адаптациям.

Доказательство того, что тренировки влекут за собой продукцию АФК в скелетной мышце, сперва было сообщено Davies et al. (1982) и поэтому многие исследований подтверждают, что сокращение мышцы заметно увеличивает количество продукции АФК по сравнению с отдыхающей мышцей. Примечательно, что благотворное воздействие физических упражнений отменяется при введении антиоксидантных соединений, таких как витамин С и Е.

Критическими компонентами этих механизмов являются митохондрии и АФК продукция. Увеличение количества митохондрий (биогенез митохондрий) улучшает контроль энергетического метаболизма и приводит к окислению большего количества жирных кислот и меньшего количества гликогена для производства АТФ. Кроме того, тренировка выносливости может улучшить митохондриальное качество через взаимоисключающие пути: изменения в митохондриальной и селективной деградации митохондрий.

Увеличенная митофагия после тренировки улучшает общее митохондриальное качество через выборочное удаление поврежденных или митохондрий.

Неблагоприятные эффекты антиоксидантной терапии свидетельствуют о том, что АФК выступают в качестве критических сигналов в физических упражнениях, поскольку уменьшение их образования предотвращает активацию важных сигнальных путей, которые вызывают полезные адаптации в мышцах.

Возможно, что в физиологических условиях скелетная мышца активизирует эндогенную программу антиоксидантной защиты для поддержания АФК на "функциональном" уровне. Действительно, регулярные

умеренные упражнения, как было показано, вызывают антиоксидантную защиту за счет повышения активности эндогенных антиоксидантных ферментов, таких как СОД, глутатион-пероксидаза и каталаза.

Тренировка большой продолжительности и интенсивности, под такими условиями как гипоксия, порождают очень высокие уровни свободных радикалов которые разрушают клетчатые противокислительные барьеры, приводя к различным повреждениям. Следует отметить, что удаление избыточного количества АФК с помощью ферментативных и неферментативных антиоксидантов задерживает мышечную усталость во время субмаксимальных сокращений [9].

Выяснено, что через месяц интенсивных тренировок вызывают долговременное снижение активности каталазы и супероксиддисмутазы и увеличение активности глутатионтрансферазы [4], [6].

Интенсивные физические нагрузки препятствуют поддержанию целостности митохондрий после избыточного производства АФК. Оно может также изменить гомеостаз кальция. Дисрегуляция Ca^{2+} может способствовать аберрантной транскрипционной активности NF- κ B, что приводит к активации протеолитических систем и истощению мышц [9].

В ациклических видах спорта (особенно в спортивных играх и единоборствах) характер мышечной деятельности меняется. Такие изменения сопровождаются несоответствием между продолжающимся повышенным поступлением кислорода и снижением его потребления митохондриями мышечных клеток. Подобное несоответствие вызывает относительную гипероксию в мышечной ткани, что, несомненно, приводит к еще большему образованию свободных радикалов и дальнейшему нарастанию их повреждающего воздействия на биомембраны. К повышению скорости свободнорадикального окисления также приводит ацидоз (повышение кислотности), возникающий у спортсменов вследствие накопления в миоцитах молочной кислоты [2].

Появление в крови ферментов процессов биологического окисления веществ альдолазы (фермент гликолиза) и каталазы (фермент, осуществляющий восстановление перекисей водорода) после физических нагрузок, является показателем неадекватности физической нагрузки, развития утомления, а скорость их исчезновения свидетельствует о скорости восстановления организма. Если физическая нагрузка вызывает значительный выход ферментов в кровь из тканей, и они долго сохраняются в ней в период отдыха, это свидетельствует о невысоком уровне тренированности спортсмена, а, возможно, и о предпатологическом состоянии организма [4], [6].

2 Материалы и методы

2.1 Материалы исследования

В эксперименте участвовали спортсмены футболисты, ориентировщики - интенсивная нагрузка в течение 90 минут, и студенты (стандартные занятия физкультурой длительностью около 45 минут). Возраст: от 19 до 30 лет. Исследуемый материал – слюна, собирался путем прямого сплевывания в пробирку. Забор слюны производили два раза: проба отбиралась до и после тренировки в течение 5-ти дней. Студенты выполняли общую тренировку, которая включает аэробную и анаэробную нагрузку. У спортсменов обеих групп тренировка проходила интенсивнее и в основном состояла из анаэробной нагрузки.

2.2 Методы исследования

Антиоксидантный статус оценивали по методу H_2O_2 -люминол зависимой хемилюминесценции. Люминол вступает в химическое взаимодействие с радикалами ($\text{HO}\cdot$ и $\text{O}_2\cdot$) и окисляется в ходе данного взаимодействия. Первая стадия – это окисление люминола каким-либо сильным оксидантом, например, радикалом или окисленной формой металла переменной валентности (рис. 5, реакции 1 и 2): Образовавшийся оксильный радикал люминола может вступать в различные реакции, которые не приведут к ХЛ: взаимодействовать с другим радикалом люминола или с одноэлектронным окислителем $\text{R}\cdot$, подвергаться дальнейшему окислению или взаимодействовать с молекулой антиоксиданта.

Второй и весьма важный этап в развитии ХЛ-реакции – появление ключевого гидропероксидного продукта (4-гидроперокси-1-окси-5-аминофалазин-4-олата), которое в биохимических системах обычно происходит при взаимодействии радикала люминола с супероксидом (рис. 3, реакция 3): Собственно ХЛ-реакция начинается с превращения гидропероксида (LOOH) в соединение, содержащее эндопероксидную химическую группу (2,3-перокси-ди[гидроксиметиленил]фениламин) (реакции 4 – 6 на рис. 3): $\text{LHOON}^- \rightarrow$ пергидрокислота \rightarrow эндопероксид- $\text{N}=\text{NH} \rightarrow$ эндопероксид- $\text{H}^+ \text{N}_2\uparrow$. На заключительном этапе в эндопероксидной группе разрывается связь между атомами кислорода и образуется молекула монопротонированной аминифталевой кислоты в электронно-возбужденном состоянии с последующим испусканием кванта света (реакции 7 и 8 на рис. 3).

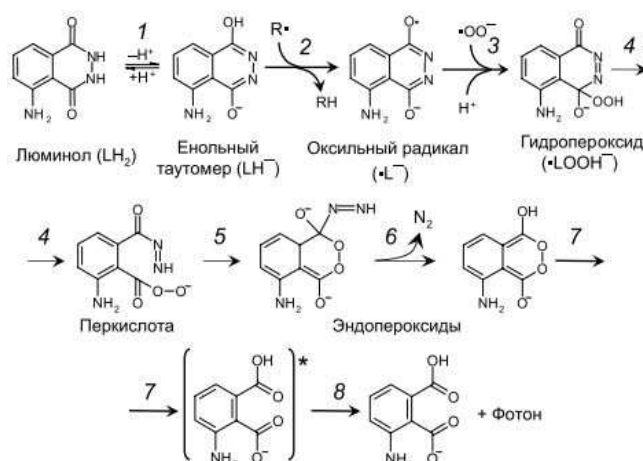


Рисунок 3 - Взаимодействию радикала люминола с супероксидом

Хемилюминесцентное исследование проводили с использованием планшетного люменометра TriStar LB 941, производства Berthold, по следующей методике: 200 мкл слюны вводили в планшет, далее добавляли по 25 мкл люминола и вводили планшет в прибор. Прибор фиксировал фоновое свечение, через 16 секунд автоматически впрыскивал 25 мкл 3% H₂O₂, которая являлась источником свободных радикалов. Измерение проходило в течение 5 мин, в ходе чего получали график динамики свечения проб. Эксперимент проводился при комнатной температуре. Анализируя график, выделены такие параметры свечения, как:

- I₀ - начальное свечение до добавления H₂O₂;
- I_{max} - максимальное свечение после добавления свободных радикалов в систему;
- A - амплитуда свечения, которую получали вычитанием I_{max} от среднего значения свечения;
- S - светосумма (S) оценивали по площади фигуры под графиком [2];
- U - скорость снижения вспышки за 60 с высчитывали по величине тангенса по формуле (5), где I_{max} - максимальное свечение, уровень свечения через 60 с после добавления перекиси.

$$U = \tan\left(\frac{I_{\max} - I(60\text{с})}{60\text{с}}\right) \quad (5)$$

- t_{max} - Время наступления максимальной интенсивности свечения.

Статистический анализ данных производили в программе Statistica 10. Достоверность различия средних величин результатов исследования оценивали по Т-критерию Вилкоксона (в течение тренировочной недели) и U-критерию Манна — Уитни (различия в работе АОС в зависимости от вида спорта и спортивного разряда). Обработку данных проводили с помощью подсчета медианы и интервального разброса (C₂₅-C₇₅ процентели).

3 Результаты исследования

Первым этапом исследование было исследование работы антиоксидантной системы слюны футболистов в динамике тренировочного процесса. Забор слюны производился до и после тренировки в течении 5 тренировочных дней. В данном эксперименте участвовала команда разных возрастов (от 20 до 30 лет) в количестве 25 человек.

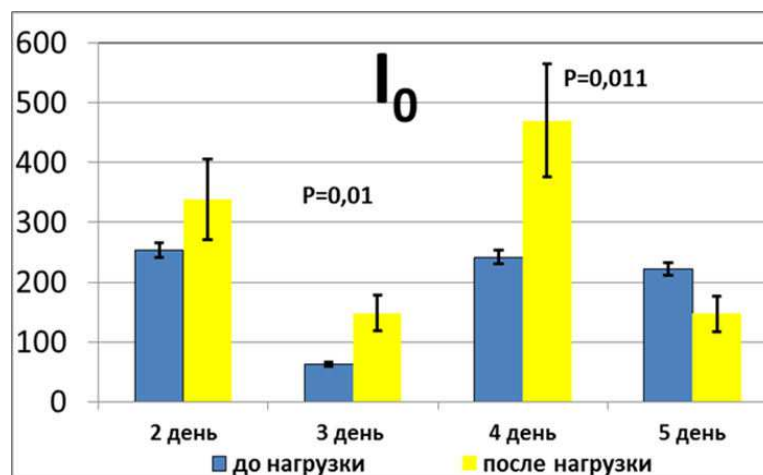


Рисунок 4 - Интенсивность начального свечения до добавления свободных радикалов в систему (в относительных единицах)

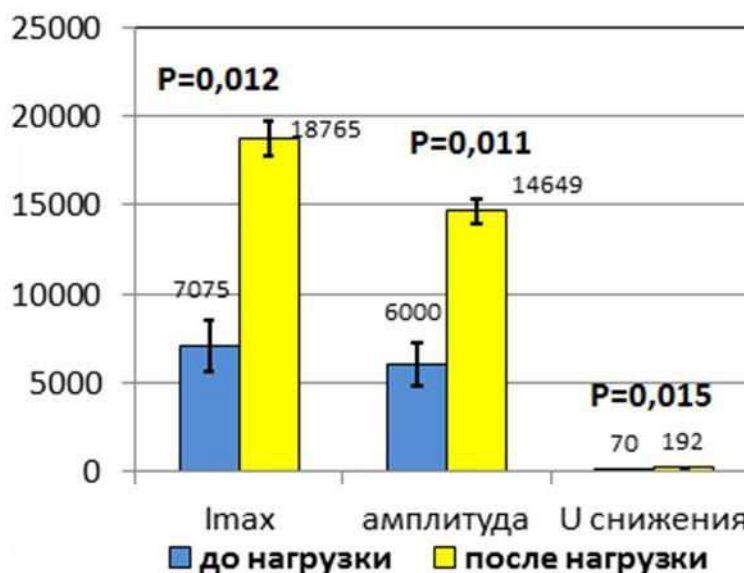


Рисунок 5 - Антиоксидантные показатели у спортсменов до и после физической нагрузки на 3 день тренировочного процесса

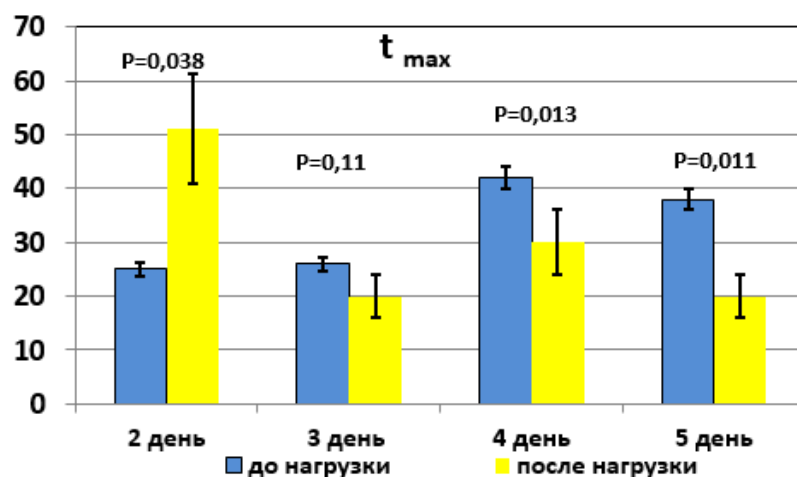


Рисунок 6 - Время регистрации максимального свечения (в секундах)

Были выявлены достоверные различия до тренировки относительно и после по параметру I_0 и t_{\max} у спортсменов на 3, 4 и на 2, 3, 4, 5 тренировочные дни соответственно (рис. 4, 6). Такие антиоксидантные показатели слюны как максимальная интенсивность, амплитуда, скорость снижения кривой были достоверно повышены на 3 день тренировочного процесса после физической нагрузки (рис. 5).

По полученным данным было выдвинуто следующее предположение: на 3 день тренировочного произошло угнетение антиоксидантной системы, так как в этот день зарегистрировано самое низкое начальное свечение и время регистрации максимальной интенсивности. Дальнейшее угнетение подтверждается изменением во времени пика максимальной интенсивности на 4 и 5 дни (до тренировки оно достоверно выше, чем после) и интенсивности начального свечения на 5 день (до тренировки выше, чем после).

Для проведения следующего эксперимента была отобрана группа спортсменов ($n=25$) в возрасте от 20 до 30 лет и студенты 2 курса ИФБиТ СФУ ($n=8$). Спортсмены занимались профессиональным спортом (футбол) и (ориентирование), которые имели спортивные разряды (КМС, МС,). Исследования спортсменов футболистов и ориентировщиков проводили в предсоревновательный период к Европейским студенческим играм в динамике течение 5-ти дней. Спортсмены на тренировках с продолжительностью 90 минут получали одинаковую физическую нагрузку. Сбор образцов слюны производили до и после интенсивной тренировки. Исследования студентов проводили на занятиях физической культурой соответствующей продолжительности и физической нагрузки. Сравнение было произведено в зависимости от вида спорта и квалификации.

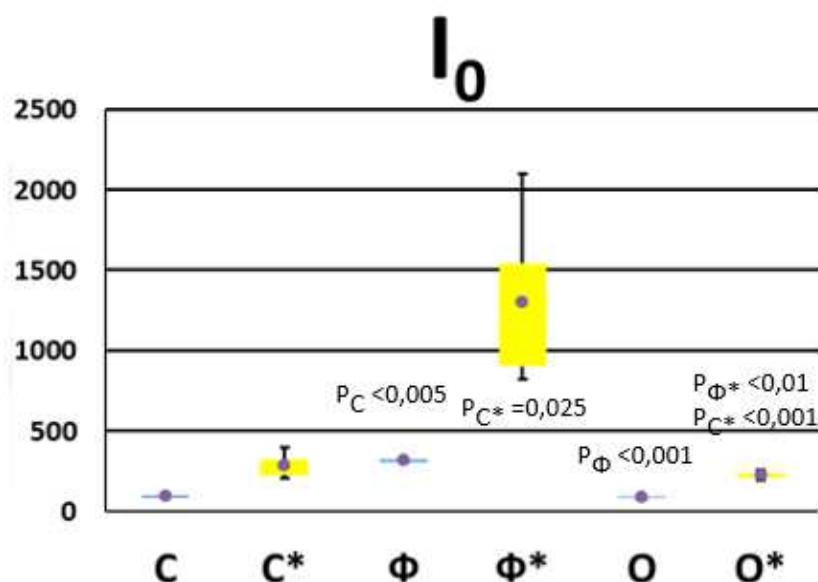


Рисунок 7 - Интенсивность начального свечения (в относительных единицах) С-показатели студентов до физической нагрузки, С*-после, Φ-показатели спортсменов (футболисты) до нагрузки, Φ*-после, О – показатели спортсменов (ориентирование) до нагрузки, О*- после

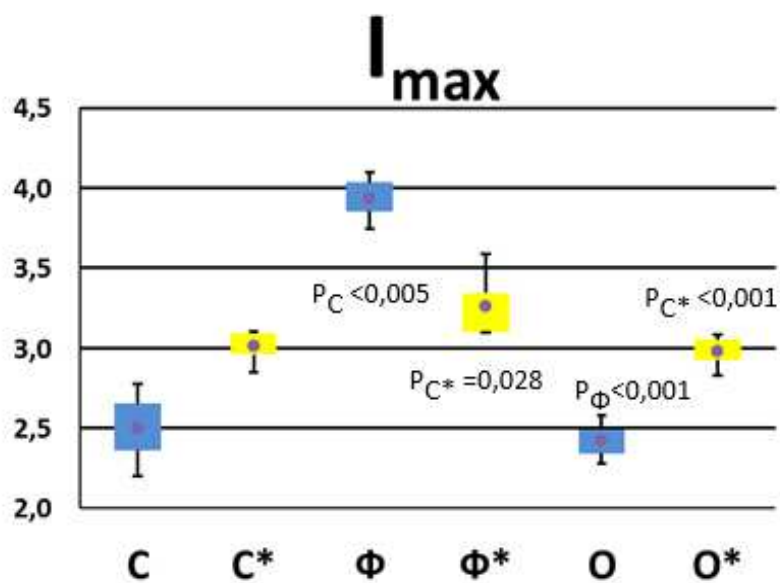


Рисунок 8 - Интенсивность максимального свечения (логарифм десятичный от относительных единиц) С-показатели студентов до физической нагрузки, С*-после, Φ-показатели спортсменов (футболисты) до нагрузки, Φ*-после, О – показатели спортсменов (ориентирование) до нагрузки, О*- после

Амплитуда

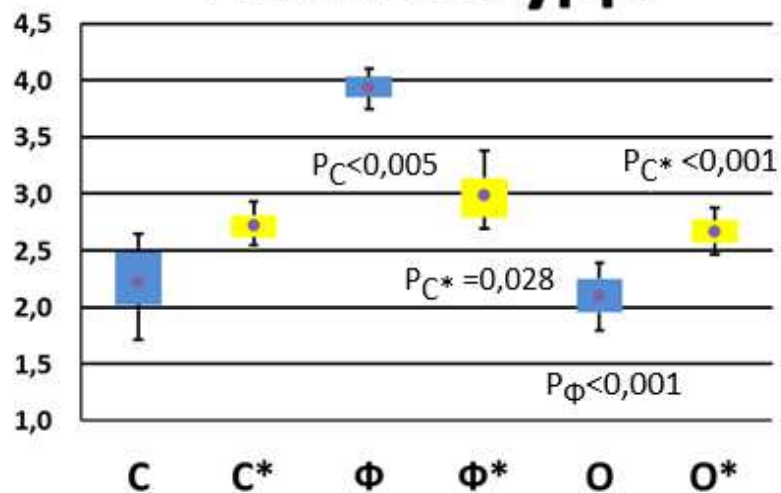


Рисунок 9 - Амплитуда (логарифм десятичный от относительных единиц)
 С-показатели студентов до физической нагрузки, С*-после, Ф-показатели спортсменов (футболисты) до нагрузки, Ф*-после, О – показатели спортсменов (ориентирование) до нагрузки, О*- после

S

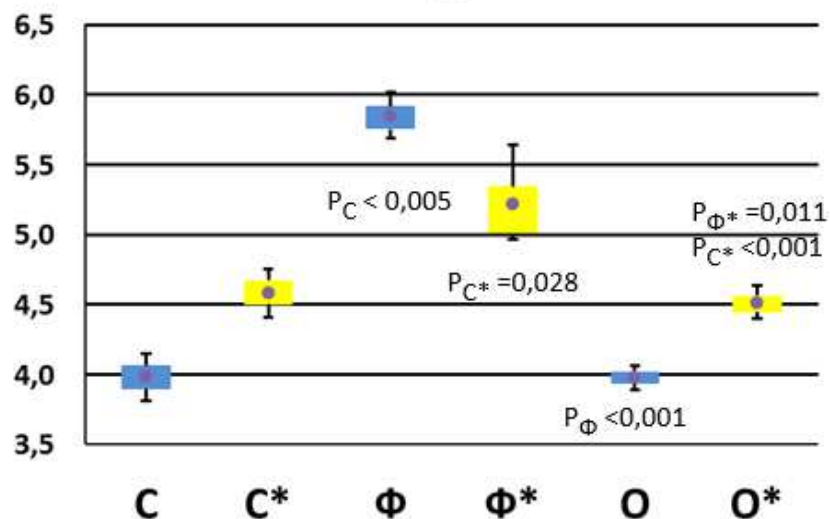


Рисунок 10 - Светосумма (логарифм десятичный от относительных единиц)
 С-показатели студентов до физической нагрузки, С*-после, Ф-показатели спортсменов (футболисты) до нагрузки, Ф*-после, О – показатели спортсменов (ориентирование) до нагрузки, О*- после

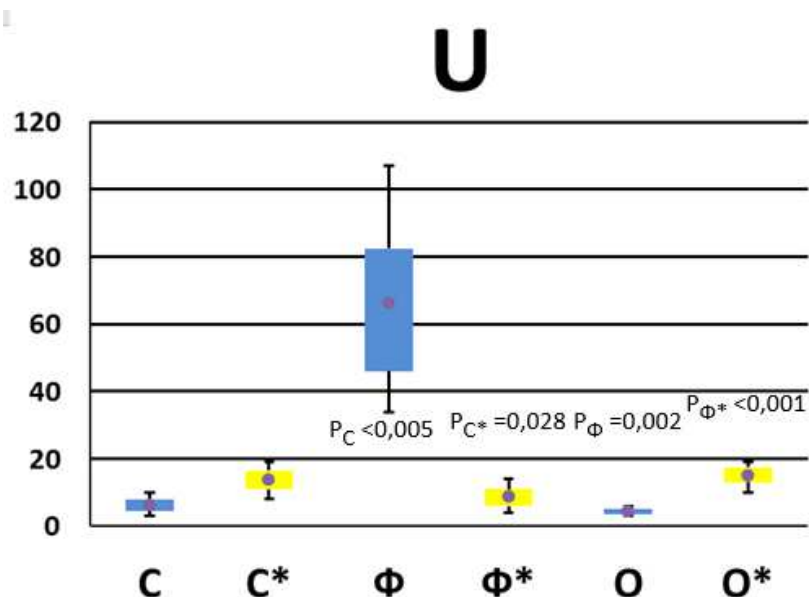


Рисунок 11 - Скорость снижения вспышки (в относительных единицах)
 С-показатели студентов до физической нагрузки, С*-после, Ф-показатели спортсменов (футболисты) до нагрузки, Ф*-после, О – показатели спортсменов (ориентирование) до нагрузки, О*- после

Результаты эксперимента показали, что характер работы АОС схож у студентов и ориентировщиков. Как правило, интенсивность работы АОС возрастает после тренировки. Совершенно другую реакцию можно увидеть у футболистов - до тренировки показатели много выше (рисунки 8, 9, 10, 11) а после падает до уровня «после» студентов и ориентировщиков. Исключение составляет лишь интенсивность начального свечения (рисунок 7). Интенсивность до тренировки у всех трех групп находится на одном уровне, но после у спортсменов этот параметр намного больше. Данные результаты могут отражать адаптацию АОС к более интенсивному по нагрузкам спорту – футболу.

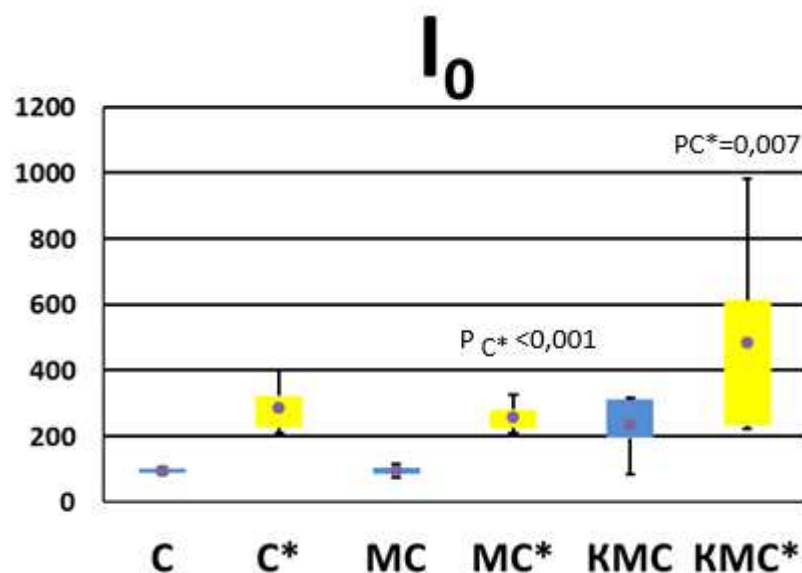


Рисунок 12 - Интенсивность начального свечения (в относительных единицах)
С-показатели студентов до физ. нагрузки, С*-после, МС-показатели мастеров спорта до нагрузки, МС*-после, КМС – показатели кандидатов в МС до нагрузки, КМС*-после

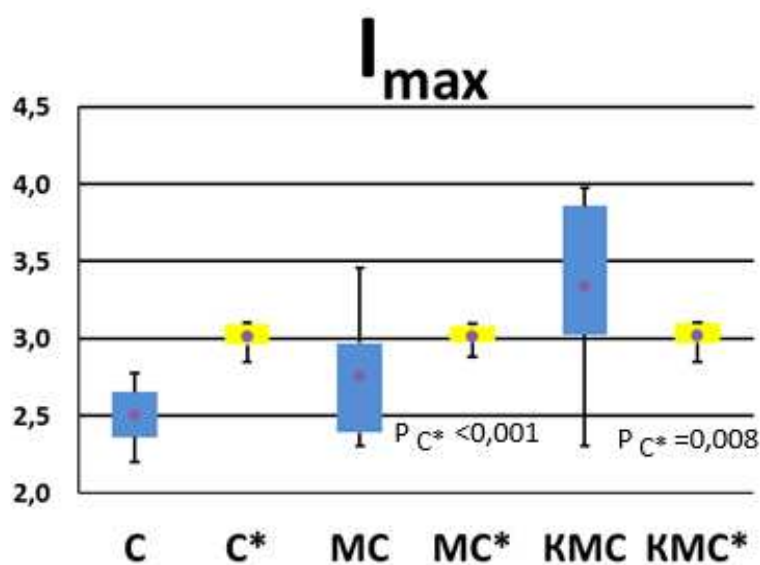


Рисунок 13 - Интенсивность максимального свечения
(логарифм десятичный от относительных единиц)
С-показатели студентов до физ. нагрузки, С*-после, МС-показатели мастеров спорта до нагрузки, МС*-после, КМС – показатели кандидатов в МС до нагрузки, КМС*-после

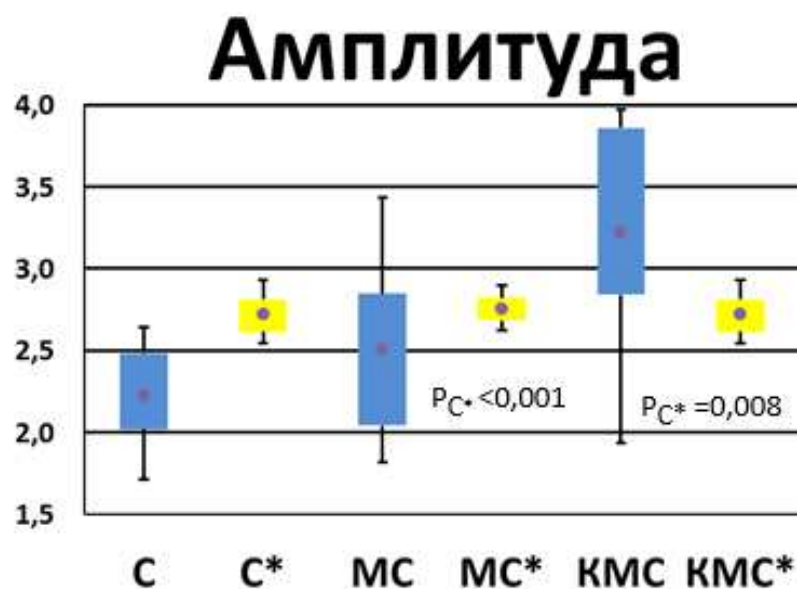


Рисунок 14 - Амплитуда (логарифм десятичный от относительных единиц)
 С-показатели студентов до физ. нагрузки, С*-после, МС-показатели мастеров спорта до нагрузки, МС*-после, КМС – показатели кандидатов в МС до нагрузки, КМС*-после

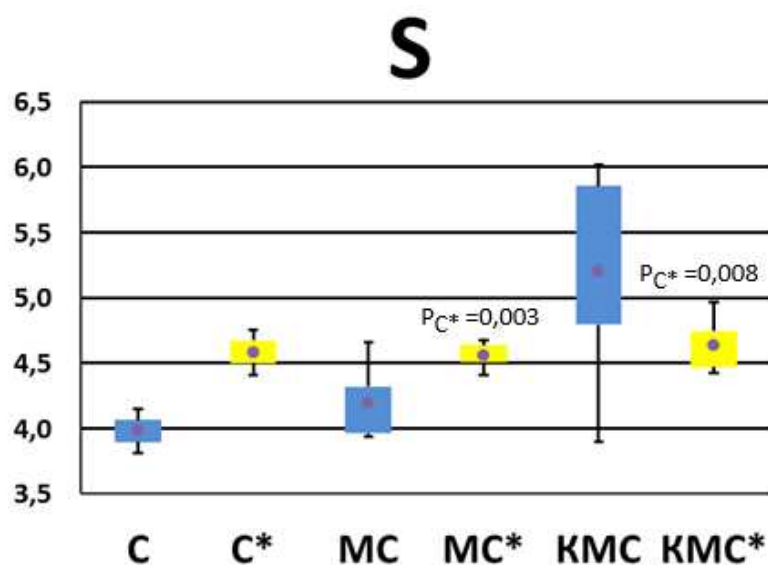


Рисунок 15 - Светосумма (логарифм десятичный от относительных единиц)
 С-показатели студентов до физ. нагрузки, С*-после, МС-показатели мастеров спорта до нагрузки, МС*-после, КМС – показатели кандидатов в МС до нагрузки, КМС*-после

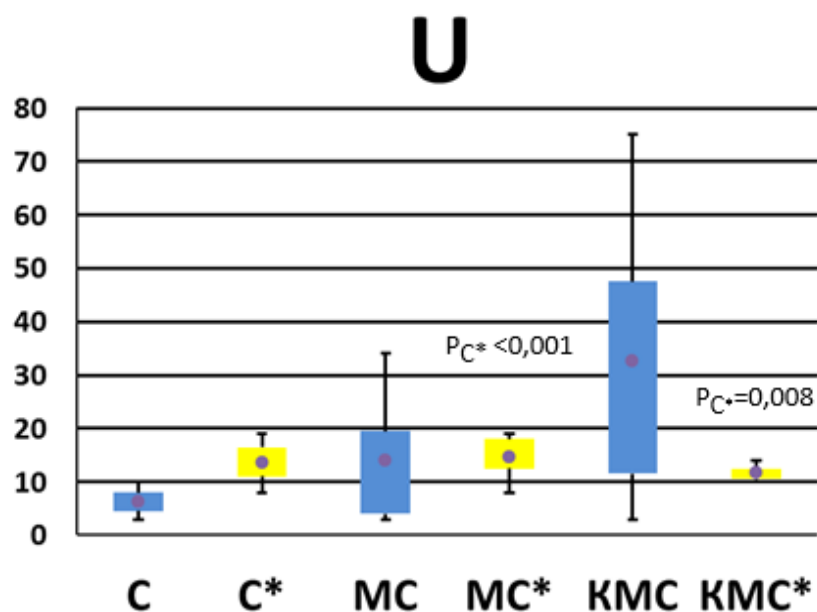


Рисунок 16 - Скорость снижения вспышки (в относительных единицах)
 C-показатели студентов до физ. нагрузки, C*-после, MC-показатели мастеров спорта до нагрузки, MC*-после, KMC – показатели кандидатов в MC до нагрузки, KMC*-после

Параметры хемилюминесцентной кривой у студентов и спортсменов до нагрузки достоверно не различаются. После нагрузки можно заметить достоверное различие по всем пяти показателям у студентов относительно обеих групп спортсменов. Относительно первой группы спортсменов, у студентов показатель начального свечения (рисунок 12) и амплитуды (рисунок 14) не различаются, светосумма (рисунок 15) и максимальное свечение (рисунок 13) ниже, скорость снижения вспышки выше. Относительно второй группы спортсменов, у студентов интенсивность начального и максимального свечения выше, а амплитуда, светосумма и скорость снижения вспышки (рисунок 16) ниже. На основании полученных данных можно предположить, что после тренировки в организме профессиональных спортсменов усиливается работа АОС, которая не позволяет вырабатываться большому количеству АФК.

Выводы

Результатами работы показана возможность применимости метода H_2O_2 -люминол зависимой хемилюминесценции для оценки антиоксидантного статуса человека во время физических нагрузок.

Результаты исследования показывают адаптивные изменения метаболической активности антиоксидантной системы в зависимости от вида спорта, квалификации спортсмена, длительности и типа физической нагрузки. При занятии интенсивными нагрузками после 3 дня происходит угнетение работы АОС. Различия обнаруживаются в разнонаправленных реакциях интенсивности свечения, площади и скорости снижения хемилюминесцентной кривой.

Список использованных источников

1. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция [Электронный ресурс] / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурина, Успехи биологической химии, т. 49, 2009, с. 341–388. – Режим доступа: <http://www.inbi.ras.ru/ubkh/49/Vladimirov.pdf>.
2. Михайлов, С.С Спортивная биохимия [Текст] : учебник для вузов и колледжей физической культуры / С.С. Михайлов – 7 изд., стереотип. М.: советский спорт, 2013. -348 с.
3. Донцов, В.И Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении [Электронный ресурс] / В. И. Донцов, В. Н. Крутько, Б. М. Мрикаев, С. В. Уханов, Труды ИСА РАН, т. 19, 2006. – Режим доступа: <http://www.isa.ru/proceedings/images/documents/2006-19/50-69.pdf>.
4. Никулин, Б.А. Биохимические маркеры утомления и восстановления после физической нагрузки [Электронный ресурс] / Б.А. Никулин Медицинский центр ООО "Вера лаб", 2015. – Режим доступа: <http://www.vera-lab.ru/info/49.html>.
5. Михайлов, С.С. Слюна как объект биохимического контроля в спорте [Электронный ресурс] / С.С. Михайлов, Е.В. Розенгарт // Ученые записки университета имени П.Ф. Лесгафта / -2008. - №6. – С. 57-61. – Режим доступа: <http://cyberleninka.ru/article/n/slyuna-kak-obekt-biohimicheskogo-kontrolya-v-sporte>.
6. Базарин, К.П. Динамические изменения активности ферментов системы антиоксидантной защиты в плазме крови у профессиональных регбистов [Электронный ресурс] / К.П. Базарин, Н.М. Титова, Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук / -2014. -№3. – С. 9-13. – Режим доступа: http://byulleten.com/images/magazines/2014_3/_2014_03_sm.pdf.
7. Birben, E. Oxidative Stress and Antioxidant Defense [Электронный ресурс] / Esra Birben, Umit Murat Sahiner, Cansin Sackesen, Serpil Erzurum, Omer Kalayci, World Allergy Organ J. 2012 Jan 13 5(1): 9–19 - Режим доступа: <https://waojournal.biomedcentral.com/articles/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
8. Ghosh, N. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage and Cell Death [Электронный ресурс] / Nandini Ghosh, Amitava Das, Scott Chaffee, Sashwati Roy, Chandan K. Sen, Immunity and Inflammation in Health and Disease, 2018, Pages 45–55 - Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128054178000044>
9. Bianca, M. The physiopathologic role of oxidative stress in skeletal muscle [Электронный ресурс] / Bianca Maria Scicchitano, Laura Pelosi , Gigliola

Sica, Antonio Musarò, Mechanisms of Ageing and Development Volume 170, March 2018, Pages 37-44 - Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0047637417300581?via%3>

10. Dihub Samet, J.M. Oxidative Stress from Environmental Exposures [Электронный ресурс] / James M. Samet, Phillip A. Wages, Current Opinion in Toxicology, Volume 7, February 2018, Pages 60-66 - Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468202017300694>


11. Valko, M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [Электронный ресурс] / Marian Valko, Dieter Leibfritz, Jan Moncola Mark T.D.Cronin, Milan Mazur, Joshua Telser, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology Volume 39, Issue 1, 2007, Pages 44-84 - Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272506002196#!>

12. Меньщикова, Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты [Текст] / Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков, И.А. Бондарь, Н.Ф. Круговых, В.А. Труфакин — М.: Фирма "Слово", 2006. — 556 с.

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологий
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 В. А. Кратасюк

подпись

« 9 » 06 2018 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

06.03.01 БИОЛОГИЯ

06.03.01.07 БИОФИЗИКА


Оценка работы антиоксидантной системы слюны у спортсменов в период
интенсивной физической нагрузки методом хемилюминесценции

Научный руководитель


подпись, дата

доцент, Коленчукова О.А.
д. б. н

Студент ББ14-01Б 0414 025 88
номер группы, номер зачетной книжки


подпись, дата

Бирюкова Е.А.

Красноярск 2018